

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Josip Vrančić, Iskra Pezdirc

Oksidacijske modifikacije izvanstaničnog matriksa induciraju Nrf2 u matičnim stanicama  
karcinoma dojke

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za oksidacijski stres, Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom mentora prof. dr. sc. Nikole Đakovića, Katedra za kliničku onkologiju, Medicinskog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu; u sklopu projekta Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti „Uloga akvaporina u adaptaciji na kronični oksidacijski stres matičnih stanica karcinoma dojke“, voditeljica projekta dr.sc. Ana Čipak Gašparović, i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

ACR- akrolein

ADH- alkohol dehidrogenaza

ALDH- aldehyd dehidrogenaza

AP- aktivirajući protein

ARE- antioksidativni element odgovora

CAF- fibroblasti povezani s tumorom

cpm- counts per minute

CSC- tumorske matične stanice

Cys- cistein

DNH- 1,4-dihidroksi-2-nonen

ER- estrogenski receptor

GCL- glutamat cistein ligaza

GSH- glutation

GSTA- glutation-S-transferaza

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- vodikov peroksid

HNA- 4-hidroksi-2- nonenoična kiselina

HNE- 4-hidroksi-2-nonenal

HO-1- hem-oksigenaza-1

IDH1- izocitrat dehidrogenazu 1

MAPK- aktivirajuća protein kinaza

MDA- malondialdehid

ME1- malični enzim 1

Nrf2- nuclear-factor erythroid 2-related factor 2

PGD- 6-fosfoglukonat dehidrogenazu

PKC- protein kinaza C

PR- progesteronski receptot

PS- polistiren

PUFA- višestruko nezasićene masne kiseline

RIS- relativni intenzitet signala

RLIP- Ral-vezujući GTP-aza aktivirajući protein

ROS- reaktivni kisikovi radikali

SOD- superoksid dismutaza

Trx- tioredoksin

TrxR- tioredoksin reduktaza

# SADRŽAJ RADA

1. UVOD .....	1
1.1 Tumori dojke .....	1
1.2 Tumorske matične stanice .....	2
1.3 Mikrookoliš .....	2
1.4 Oksidacijski stres.....	3
1.5 Metabolizam.....	4
1.6 HNE kao signalna molekula.....	5
1.7 Antioksidacijska zaštita.....	7
2. HIPOTEZA .....	9
3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....	9
4. MATERIJALI I METODE .....	9
4.1 Materijali .....	9
4.2 Uzgoj stanica .....	9
4.3 Priprema otopine HNE-a .....	10
4.4 Oblaganje kolagenom i tretman kolagena HNE-om.....	10
4.5 Tretman stanica .....	11
4.6 MTT test.....	12
4.7 Test ugradnje <sup>3</sup> H-timidina .....	12
4.8 Ukupni glutation.....	12
4.9 Katalaza.....	13
4.10 Kapljična analiza proteina .....	13
4.11 Western blot .....	13
4.12 Statistička analiza .....	14
5. REZULTATI.....	14
5.1 MTT test.....	14
5.2 Test ugradnje <sup>3</sup> H-timidina .....	15
5.3 Glutation.....	17
5.4 Katalaza.....	17
5.5 Kapljična analiza proteina .....	18
5.6 Western blot .....	21
6. RASPRAVA.....	21
7. ZAKLJUČCI .....	25
8. ZAHVALE.....	26

9. POPIS LITERATURE ..... 26  
10. SAŽETAK..... 29  
11. SUMMARY ..... 30

## 1. UVOD

### 1.1 Tumori dojke

Tumor dojke je najčešći uzrok smrti od karcinoma među ženama u svijetu pa tako ni Hrvatska nije iznimka (1). Svakoj desetoj ženi u Hrvatskoj prijete rak dojke te je incidencija tog tumora u 2013. godini bila 115,3/100.000. Mortalitet od raka dojke u 2013. godini bio je 44,8/100.000 (2).

Zašto tumor dojke nastaje i dalje ostaje nepoznanica, ali danas znamo da je ključ u trima čimbenicima: a) genetskim, b) hormonskim i c) okolišnim. Zbog naravi ovoga rada fokusirat ćemo se na genetske čimbenike jer su, između ostalog, uključeni u taksonomiju tumora dojke te s obzirom na genetski status tumora, možemo i zaključiti kakav će biti konačni ishod bolesti. Mutacije koje utječu na protoonkogene i na tumor supresorske gene imaju veliki utjecaj u nastajanju svakog tumora pa tako i u nastanku tumora dojke. Jedna od najbolje istraženih je povećana ekspresija HER2/neu protoonkogeni koji je posljedica amplifikacije. Ovaj gen član je obitelji receptora epidermalnog čimbenika rasta te je njegova povećana ekspresija povezana s lošijom prognozom. Amplifikacija RAS-a i MYC-a također može biti prisutna. Promotorska regija gena za estrogenski i progesteronski receptor (ER i PR) može biti hipermetilirana, što posljedično dovodi do prestanka transkripcije te smanjenja translacije, čime se dobiva ER-/PR- fenotip. Mnoge od ovih promjena prisutne su u tumorima dojke te s obzirom na njih, tumore dojke dijelimo u 4 velike skupine čije je poznavanje bitno zbog različitog pristupa u liječenju, boljeg razumijevanja tumorskog ponašanja i konačnog ishoda. Te skupine su: 1) Luminal A (ER+ i HER2/NEU-) 2) Luminal B (ER+ i HER2/NEU-) 3) HER2/NEU+ ER- 4) nalik bazalnim stanicama (ER-, PR- i HER2/NEU-). Iako rijedak, tumor dojke nalik bazalnim stanicama zbog negativnog izražaja estrogenskih, progesteronskih i receptora za epidermalni čimbenik rasta (HER2), još se naziva i trostruko negativnim te ima najlošiji ishod od svih tumora dojke (3,4)

Osim ove podjele, često primjenjivana je i morfološka podjela tumora dojke. Dijelimo ih na invazivne i na neinvazivne (tablica 1). Budući da nam morfološka podjela nije osobito bitna za razumijevanje daljnjeg teksta, nećemo ići u dublju analizu, ali bitno ju je imati na umu zbog prognostičkih i kurativnih razloga.

Tablica 1. Morfološka podjela tumora dojke

NEINVAZIVNI	INVAZIVNI
Duktalni karcinom in situ (DCIS)	Invazivni duktalni karcinom
Lobularni karcinom in situ (LCIS)	Invazivni lobularni karcinom
	Medularni karcinom
	Koloidni (mucinozni) karcinom
	Tubularni karcinom
	Ostali

Temeljem svega navedenog, možemo vidjeti zašto je znanstvenicima širom svijeta, pa tako i nama, od velikog interesa istraživanje i otkrivanje obrazaca ponašanja upravo tog karcinoma.

### 1.2 Tumorske matične stanice

Za visok mortalitet od raka dojke možemo između ostalog okriviti njegovu veliku sposobnost metastaziranja. Uslijed toga krivulje preživljenja ovog tumora dosežu plato tek nakon 7 do 10 godina (5). Do prije nekoliko desetljeća, nije se znalo zbog čega tumor dojke pokazuje tako veliku agresivnost i sklonost metastaziranju, sve dok nije predložen model tumorskih matičnih stanica dojke (CSC od eng. cancer stem cells) (6). Taj model govori da svaki tumor posjeduje subpopulaciju stanica koje su sposobne samoobnavljati se sporim staničnim ciklusom, te asimetričnom diobom dviju stanica različitog proliferacijskog i razvojnog potencijala tj. stanice različitog fenotipa karakteristične za svaki tumor (7). Kao što solidni organi nastaju iz pluripotentnih matičnih stanica, tako i tumori pokazuju hijerarhijski ustroj te su CSC prve u hijerarhijskom lancu stanica tumora (8). Dokazano je da CSC potiču nastanak tumorskih krvnih žila, povećavaju mobilnost tumorskih stanica, odgovorne su za nastanak metastaza (osobito koštanih kod raka dojke) te su sposobne oduprijeti se djelovanju antitumorskih agensa te se upravo zbog toga povezuju s većom agresivnošću (8,9). CSC karcinoma dojke pokazuju poseban fenotip  $CD44^+CD24^{-/low}ESA^+$ . Što je udio stanica s ovim fenotipom u tumoru veći, to je veća i njegova agresivnost i metastatski potencijal (9).

### 1.3 Mikrookoliš

O smjeru u kojem će se normalne matične stanice razvijati suodgovoran je i stanični mikrookoliš (9). Stanični mikrookoliš održava matične stanice u mirovanju i tako održava homeostazu. Međutim uvjeti kronične upale ili cijeljenja dovode do poremećaja u staničnom mikrookolišu, čime se stanicama pruža mogućnost izbjegavanja imune kontrole. Posljedica toga je aktivacija i ekspanzija CSC-a te stvaranja metastaza. Novi mikrookoliš u kojem se CSC nađu, ne mora podržavati rast CSC-a te one postaju dormantne. Ukoliko je taj mikrookoliš izložen stresu npr. upali, koja je često stanje u pacijenata koji se

liječe od raka, ponovno može doći do aktivacije i ekspanzije CSC (7,9). Ova činjenica može biti osobito važna u daljnjem razvoju antitumorske terapije budući da i radioterapija i terapija doksorubicinom koje se učestalo koriste u terapiji tumora dojke, dovode do, između ostalog, oksidacijskog stresa (9). Pokazalo se da dijelovi tumorskog mikrookoliša mogu biti poticajni za CSC, ali i ostale tumorske stanice te time činiti tumor više ili manje agresivnim (7). Ovdje je bitno naglasiti da se tumor i tumorski mikrookoliš ne smiju gledati kao dvije odvojene jedinice već kao jednu funkcionalnu cjelinu koja se sastoji od tumorskih stanica i kompleksne mreže izvanstaničnog matriksa koja služi kao potpora i nužan vitalni čimbenik tumorskim stanicama. Iskorištavaju li CSC već postojeći mikrookoliš ili stvaraju vlastiti još je jedna tema o kojoj se ne zna mnogo. Zna se, međutim, da CSC iskorištavaju stanice mikrookoliša te su tako npr. prepoznati fibroblasti povezani s tumorom (CAF od eng. cancer-associated fibroblasts) koji reguliraju proizvodnju različitih citokina, faktora rasta, proteina izvanstaničnog matriksa, nekoliko tipova matriksnih metaloproteinaza i aktivatora plazminogena (7) čime potpomažu rast i ekspanziju tumora. Važno je spomenuti kolagen kao glavni protein izvanstaničnog matriksa koji u normalnim uvjetima služi kao barijera u obrani od infekcija, toksičnih agensa i tumora (9). Međutim, stres mikrookoliša, a time i kolagena, uzrokuje promjene u adheziji i ponovnu pojavu onkofetalnog/laminin vezujućeg (OF/LB od eng. oncofoetal, laminin-binding) kolagena. Iz navedenog može se zaključiti da je i kolagen bitan faktor u razvoju i ekspanziji tumora (9).

#### 1.4 Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je poremećaj u staničnoj redoks ravnoteži te je često uzrokovan reaktivnim kisikovim vrstama (ROS od eng. reactive oxygen species). ROS se definiraju kao kemijske vrste, radikali i spojevi, koji sadrže kisik i odlikuje ih visoka reaktivnost. Uključuju superoksidni ( $O_2^{\cdot-}$ ) i hidroksilni ( $HO^{\cdot}$ ) radikal, kao i neke ne-radikale, primjerice vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) (10). Najvažniji endogeni izvori ROS-a su mitohondriji, stanična membrana, endoplazmatski retikulum i peroksisomi. Nastanak ROS-a veže se uz široku lepezu mehanizama koja uključuje enzimske reakcije i izvanjske stimulanse poput ionizirajućeg zračenja, ultraljubičastog dijela spektra, duhanskog dima, infekcija, okolišnih toksina i izloženosti herbicidima/insekticidima. Oksidacijski stres upleten je u brojna patološka stanja organizma uključujući upalu, aterosklerozu, neurodegenerativne bolesti i rak.

ROS ulaze u reakcije sa svim staničnim molekulama, a lipidi su posebno osjetljivi. Lipidna peroksidacija je proces tijekom kojeg oksidansi napadaju dvostruke veze ugljika u lipidima, a posebno su osjetljive višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA od eng. polyunsaturated fatty acids). čitav proces lipidne peroksidacije odvija se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija. U kaskadi reakcija nastaju lipidni peroksilni radikali i hidroperoksidi. Krajnji rezultat lipidne peroksidacije je velik broj produkata, reaktivnih aldehida, među kojima se malondialdehid (MDA), 4- hidroksinonenal (HNE) i akrolein (ACR) smatraju biološki najznačajnijima.



Za razliku od kratkoživućih ROS, reaktivni aldehidi su dugoživući, vodotopivi spojevi, koji imaju sposobnost difuzije s mjesta nastanka čime obnašaju ulogu „drugih glasnika oksidacijskog stresa“ (11).

HNE je najistraživaniji predstavnik 4-hidroksialkenala koji nastaje peroksidacijom omega-6 masnih kiselina (12), među koje se ubraja i arahidonska kiselina. Otkriven je 60-ih godina prošlog stoljeća, dok je u 80-ima privukao interes kao citotoksični produkt peroksidacije mikrosomskih lipida jetre. Nastavak istraživanja pokazao je kako reaktivni aldehidi imaju značajan genotoksičan efekt u ljudi (13). Danas se zna da HNE može kovalentno modificirati brojne makromolekule kao što su DNA i proteini (12). Interakcije s proteinima su posebno zanimljive jer mogu izazvati dugoročne promjene u stanici kada HNE reagira s transkripcijskim faktorima osjetljivima na stres poput: Nrf2, AP-1, NFkB i PPAR i ovisno o koncentraciji i biološkim uvjetima može potaknuti proliferaciju/diferencijaciju, autofagiju, nekrozu ili apoptozu (13). Često se koncentracije HNE-a od 1 do 10uM smatraju fiziološkima, suprafiziološkima koncentracije od 10-100uM, a one veće od 100uM toksičnima.

### 1.5 Metabolizam

Glavni cilj brzog unutarstaničnog metabolizma HNE-a je zaštita proteina od mogućih modifikacija aldehidnim produktima lipidne peroksidacije. Biokemijski putevi metabolizma HNE-a koji vode do formacije srodnog alkohola 1,4-dihidroksi-2-nonena (DNH), kiseline 4-hidroksi-2- nonenoične kiseline (HNA), i HNE- glutationskih konjugata ovise o razini stresa:

1. U fiziološkim uvjetima ili uvjetima niskog stresa glavni korak u detoksikacija HNE-a je konjugacija s glutationom (GSH) praćena NADH-ovisnom alkohol dehidrogenazom (ADH) kataliziranom redukcijom do glutionil-DNH i/ili aldehid dehidrogenazom (ALDH) kataliziranom oksidacijom do glutionil-HNA
2. U uvjetima umjerenog stresa HNE, bez prethodne reakcije s GSH, oksidira ALDH te kao produkt nastaje slobodni HNA, koji kasnije može biti metaboliziran u mitohondrijima beta-oksidacijom od strane citokroma P450 te kao produkt te reakcije nastaje 9-hidroksi-HNA
3. U uvjetima visokog stresa, HNE je supstrat za ADH (koja pripada superporodici aldo-keto reduktaza (AKR)) te nastaje DNH (13).

Već je spomenuto kako je bitna razina HNE-a unutar stanice za metabolički put kojim će se HNE razgraditi. Za ovo je bitna glutation-S-transferaza, GSTA4-4, specifična za HNE (14) koja katalizira stvaranje konjugata s GSH. Nakon stvaranja konjugata HNE-GS, oni se ATP-u ovisnim transportom izbacuju iz stanice putem transportnog 76kDa Ral-vezujućim GTP-aza aktivirajućim proteinom (RLIP76) (15). Nadalje, stvaranjem GS-DNH aktiviraju se PLC, PKC, IKKalfa/beta i NFkB, signalni putevi koji sudjeluju u regulaciji imunog odgovora (13).

## 1.6 HNE kao signalna molekula

Utjecaj HNE-a na transkripcijske faktore osjetljive na stres poput Nrf2 (nuclear-factor erythroid 2-related factor 2), AP-1 (activating protein-1), NFkB, PPAR (peroxisome-proliferator-activated receptors) omogućava stanicama adaptaciju i efikasnu obranu od stresora. HNE također modulira i utječe na mitogen-aktivirajuću protein kinazu (MAPK), signalni put receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR/Akt signalni put), modulira aktivnost protein kinaze C (PKC) te tako ostvaruje svoju široku lepezu aktivnosti i utjecaja na ključne puteve staničnog preživljenja, proliferacije i diferencijacije (11).

Mnoge su nezavisne studije potvrdile HNEom uzrokovanu indukciju aktivnosti Nrf2 kao primarni senzor i regulator odgovora na oksidacijski stres (16).

U fiziološkim uvjetima Nrf2 je u citoplazmi vezan na represorski protein Keap1, čime se ubikvitira Cul3-Keap1 ubikvintin E3 ligaznim kompleksom što dovodi do posljedične brze razgradnje u proteasomima. Prilikom izlaganja stanice oksidacijskom stresu i elektrofilnim molekulama, dolazi do modifikacije reaktivnih cisteinskih ostataka Keap1 i promjene konformacije kompleksa te dolazi do otpuštanja Nrf2, translokacije u jezgru i transkripcije mnogih citoprotektivnih gena u sklopu antioksidativnog elementa odgovora (ARE- antioxidative response element) (17). Glavni geni koji podliježu indukciji od strane HNE-Nrf2-ARE su:

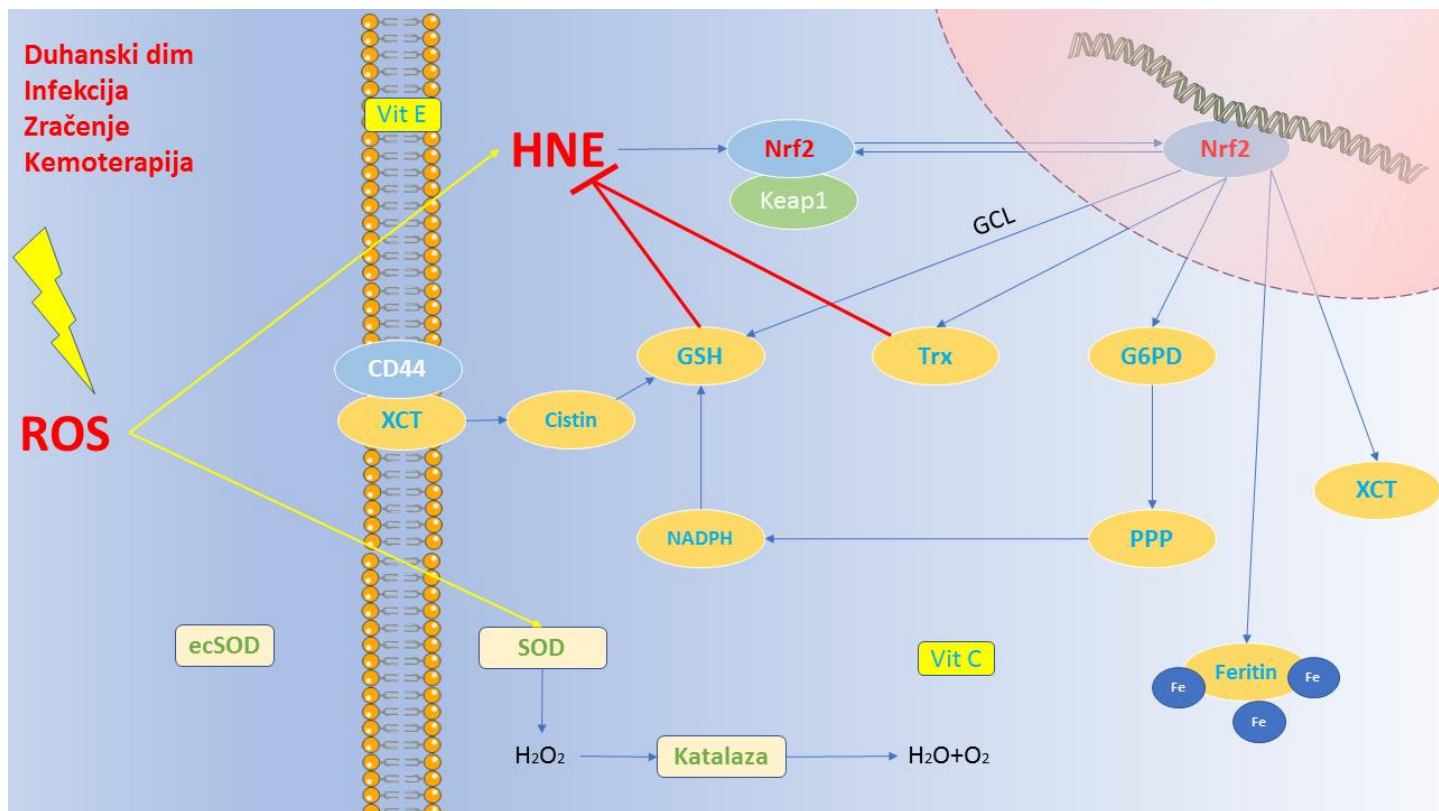
1. Hem-oksigenaza-1 (HO-1), antioksidacijski protein koji katalizira pretvorbu hema u biliverdin, nakon čega slijedi pretvorba potonjeg u bilirubin. I biliverdin i bilirubin imaju važna antioksidacijska svojstva, a dokazana je povišena aktivnost HO-1 kao posljedica izloženosti HNEu.
2. Tiodredoksin (Trx) i tiodredoksin reduktaza (TrxR); Trx je mali ubikvitarni antioksidacijski protein s dva cisteinska (Cys) ostatka u katalitičkoj regiji, a TrxR je NADPH ovisni enzim zadužen za redukciju Trx u njegov aktivan oblik. Dokazana je uloga HNE kao induktora aktivnosti sustava Trx/TrxR.
3. Glutamat cistein ligaza (GCL); enzim zadužen za najvažniji korak u sintezi GSH, također je podložan indukciji putem sustava HNE-Nrf2
4. Aldo-keto reduktaze/AKR (13)

Osim što kontrolira ekspresiju glutamat-cistein ligaze, Nrf2 također kontrolira dostupnost cisteina unutar stanica. Potonje je posljedica povećane ekspresije SCL7A11 gena, koji kodira cistin-glutamatni transporter XCT. U izmjeni koju katalizira XCT, glutamat izlazi, a cistin ulazi u stanicu. Cistin se dalje reducira u cistein, što je katalizirano tiodredoksin-reduktazom ili GSH ovisnim sustavom. Također, cistein je zajedno sa selenom u formi selenocisteina, dio aktivnog katalitičkog mjesta tiodredoksin-reduktaze i glutation-

peroksidaze. XCT je stabiliziran od strane CD44, površinskog s tumorima povezanog antigena, koji je također marker matičnih stanica karcinoma (10).

S obzirom na važnu ulogu Nrf2/Keap1 sustava u obrani od oksidacijskog stresa i ksenobiotika, mnogo je pažnje posvećeno ulozi mutacija i Nrf2 i Keap1 u humanim karcinomima, koje bi pružale teorijsku podlogu za obranu malignih stanica od oksidacijskog stresa uzrokovanog kemo- i radioterapijom i posljedičnu rezistenciju na terapiju. Tako su „missense“ mutacije Keap1 pronađene u adenokarcinomu pluća, a inaktivacija Keap1 somatskom mutacijom koja je dovela do zamjene aminokiselina, uočena je u karcinomima pluća, žučnog mjehura i jetre. Kao dodatni mehanizam smanjene aktivnosti Keap1, otkrivena je povećana metilacija promotorske regije Keap1 u plućima i prostati. U oba slučaja, funkcija Keap1 je kompromitirana što dovodi do konstitutivne stabilizacije i povećane aktivnosti Nrf2 i posljedične aktivacije citoprotektivnih gena. Jednako tako su otkrivene mutacije Nrf2, i to ETGE motiva koje ometaju vezanje visokim afinitetom, te unutar DLG motiva koje ometaju vezanje niskim afinitetom. Zanimljiva je interakcija proteinskog induktora p62, poliubikvintin vežućeg proteina ključnog za autofagiju brojnih staničnih supstrata. Protein p62 ometa niskoafinitetno mjesto interakcije Nrf2/Keap1, te dovodi do konstitutivne aktivacije Nrf2. Abnormalna akumulacija p62 uočena je u mnogim karcinomima (18).

Tumorski supresor BRCA1, pojačano eksprimiran u linijama matičnih stanica karcinoma dojke pa tako i u SUM159 staničnoj liniji (19), također dio svojih učinaka ostvaruje modulacijom oksidacijskog stresa. Interakcijom s Cul3-Keap1 ubikvintin E3 ligaznim kompleksom BRCA1 povećava stabilnost Nrf2 u odgovoru na oksidacijski stres (20). BRCA1 pozitivno regulira Nrf2, i ta interakcija osim utjecaja na tkivnu antioksidacijsku zaštitu ima i moguće implikacije na otpornost matičnih stanica na terapiju (21).



Slika 1. Antioksidacijska zaštita stanice i uloga Nrf2.

ecSOD- izvanstanična forma superoksid dismutaze, G6PD- glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, GSH- glutation, HNE- 4-hidroksinonenal, PPP- pentoza fosfatni put, SOD- superoksid dismutaza, Trx- tioredoksin, XCT- cistin-glutamatni transporter

### 1.7 Antioksidacijska zaštita

Stanice raka odlikuje povećana anaerobna glikoliza (Warburgov efekt) i visoka razina oksidacijskog stresa. Visoka razina oksidacijskog stresa je posljedica nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta kao rezultat disbalansa između njihova stvaranja i uklanjanja. Visoka koncentracija ROS-a, a time i reaktivnih aldehida, posljedica je promjena više signalnih puteva koje se odražavaju na metabolizam stanica raka. Te visoke koncentracije ROS neutraliziraju se povećanim antioksidacijskim obrambenim mehanizmima stanica raka (10).

Kako bi se učinkovito zaštitile od štetnih učinaka oksidacijskog stresa stanice su razvile raznovrsne mehanizme obrane koje u praktične svrhe možemo podijeliti na neenzimatske i enzimatske.

Superoksid dismutaze (SOD) su prva linija obrane od superoksidnih aniona. Mn-SOD lokalizirana je u mitohondrijskom matriksu, dok je ZnCu-SOD u citoplazmi. Izvanstanična izoforma SOD (EC-SOD),

izlučuje se van stanica u obliku homotetramera, a u plućima se vezuje uz područja s visokim sadržajem kolagena tipa I poput intralveolarnih septa. Snižena aktivnost CuZn superoksid dismutaze često se pronalazi u tumorima, te daje naslutiti kako bi snižena obrana zajedno s njihovom povećanom produkcijom ROS-a mogla biti jedan od ključnih koraka u karcinogenezi (22).

Vodikov peroksid, proizveden enzimatskim djelovanjem SOD ili oksidaza poput ksantin oksidaze, reducira se do vode djelovanjem katalaze i glutacion-peroksidaze. Katalaza, jedan od najefikasnijih enzima uopće, najzaslužnija je za brzu razgradnju vodikova peroksida (23), i privlači pozornost kao potencijalno važan faktor u razvoju tumora i njihovu odgovoru na terapiju. Tako povećana ekspresija katalaze u stanicama karcinoma dojke dovodi do smanjenog proliferacijskog i migracijskog kapaciteta i izmijenjenog odgovora na kemoterapeutike i zračenje (24).

Peroksidaze su grupa enzima zadužena za redukciju organskih i anorganskih peroksida. Za razliku od SOD i katalaze, peroksidaze nisu ovisne o metalima u aktivnom mjestu enzima, već u aktivnom mjestu ključnu ulogu obnaša cistein. Prema tome, razlikujemo dvije grupe peroksidaza: glutacion peroksidaze (koje koriste GSH kao donor elektrona) i tioredoksin peroksidaze (TRX kao donor elektrona). GSH peroksidaze u reakcijama redukcije koriste GSH kao donor elektrona, što dovodi do nastanka oksidiranog glutaciona (GSSG), koji se potom reducira u nativni oblik djelovanjem glutacion reduktaze koja kao kofaktor koristi NADPH. Tioredoksin peroksidaze reduciraju hidroperokside koristeći tioredoksin kao donor elektrona, koji se potom obnavlja djelovanjem, također NADPH-ovisne, tioredoksin reduktaze (23).

Zajednička osobina nabrojanih antioksidacijskih enzima je NADPH kao reducirajući ekvivalent. NADPH uz to što je kofaktor tioredoksin i glutacion reduktazi, također održava i katalazu u aktivnoj formi. Unutarstanični NADPH pretežno nastaje djelovanjem glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD), prvog koraka pentoza fosfatnog puta, te obnaša ključnu ulogu u održavanju puferskog kapaciteta unutarstaničnog glutaciona (GSH/GSSG) (10).

Zanimljivo je da Nrf2 kontrolira ekspresiju G6PD čime sudjeluje u preusmjeravanju glukoze u pentoza fosfatni put. Osim G6PD, Nrf2 regulira ekspresiju i preostala 3 stanična enzima putem čijeg djelovanja nastaje NADPH: malični enzim 1 (ME1), 6-fosfoglukonat dehidrogenazu (PGD), izocitrat dehidrogenazu 1 (IDH1). Ovime je dodatno naglašena središnja, regulacijska uloga Nrf2 u odgovoru na oksidacijski stres (25).

Neenzimatski antioksidansi su male hidro- i liposulobilne molekule za nespecifičnu zaštitu od slobodnih radikala. Glutacion (GSH) je jedan od najvažnijih predstavnika neenzimatskih antioksidansa, iako može sudjelovati i u enzimskoj kaskadi kao kofaktor. Omjer oksidirane i reducirane forme (GSH/GSSG) jedan je od najznačajnijih odrednica oksidacijskog stresa. Kao supstrat za enzime glutacion peroksidazu i transferazu

štiti stanice od djelovanja vodikova peroksida, štiti membranu od lipidne peroksidacije i obnaša ključnu ulogu u redukciji vitamina C i E u izvorne oblike.

Vitamin C, odnosno L-askorbinska kiselina, obnaša ulogu unutar- i izvanstaničnog antioksidansa vodene faze primarno odstranjujući ROS. Uz to, esencijalan je za konverziju slobodnih radikala vitamina E u nativnu formu vitamina E.

Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) nalazi se u hidrofobnim unutarnjim područjima stanične membrane i ključan je obrani membrane od oksidacijskih oštećenja. Vitamin E kao donor elektrona peroksilnom radikalu, međuproduktu lipidne peroksidacije, zaustavlja pokrenutu kaskadu reakcija, štiti integritet membrane a time i stanicu od krajnjih produkata lipidne peroksidacije. Alfa-tokoferol je najaktivnija forma vitamina E i glavni membranski antioksidans stanica (23).

## 2. HIPOTEZA

Oksidacijske modifikacije izvanstaničnog matriksa potpomažu adaptaciju matičnih stanica karcinoma dojke na kronični oksidacijski stres i posredno uzrokuju povećani maligni potencijal stanica.

## 3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Cilj našeg eksperimenta bio je utvrditi hoće li modifikacije izvanstaničnog matriksa oksidacijskim stresom promijeniti obrazac reagiranja stanica na kronični oksidacijski stres i hoće li doći do promjena antioksidacijskog kapaciteta stanica.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1 Materijali

Svi materijali kupljeni su od Sigma-e (Austrija) ukoliko nije navedeno drugačije. Mikrotitarske pločice za uzgoj staničnih kultura kupljene su od TPP (Švicarska). Boce za uzgoj kultura mamosfera s vrlo niskim afinitetom prianjanja stanica (nisko-adherentnoj) kupljene su od Lonze (Švicarska).

### 4.2 Uzgoj stanica

Stanična linija karcinoma dojke SUM159 nabavljena je od Asteranda (Detroit, MI, SAD), i uzgojena prema uputama dobavljača. Matične stanice karcinoma dojke eksprimiraju  $CD44^+/CD24^{-low}/ESA^+$  i sposobne su formirati mamosfere, što je specifično obilježje matičnih stanica karcinoma (26). Stoga smo uzgojili stanice u uvjetima koji induciraju mamosfere: u posebnom za to predviđenom mediju, s faktorima rasta i u nisko-adherentnim bocama za stanične kulture. Kao medij rabili smo MEBM (od eng. mammary epithelial basal

medium; Lonza, Basel, Switzerland), bez seruma, uz suplemente: 10ng/ml bFGF (od eng. basic fibroblast growth factor), 20ng/ml EGF (od eng. epidermal growth factor; Peprotech, New York, SAD), B27 (Invitrogen) i 5000 IU/ml heparina. Nakon odmrzavanja, stanice smo pratili i redovito im mijenjali medij do formiranja mamosfera. S obzirom na prethodne eksperimente laboratorija u kojima su dokazivani markeri matičnih stanica (26), ovako uzgojene stanice mogu se smatrati matičnim stanicama karcinoma dojke, sa sličnim karakteristikama kao i stanice koje u ljudskom organizmu iniciraju metastaze i diseminaciju tumora.

#### 4.3 Priprema otopine HNE-a

Matičnu otopinu HNE-a pripremili smo tako da smo ispuhali kloroform iz otopine HNE-diacetala u kloroformu. Zatim smo HNE aktivirali u 1 mM octenoj kiselini 24h. Nakon 24 sata snimili smo spektar HNE-a u rasponu od 350 do 200 nm te iz maksimuma apsorbancije na 223 nm, odredili koncentraciju koja je iznosila 20,47 mM. Za MTT test i test ugradnje <sup>3</sup>H-timidna, iz matične otopine HNE-a pripremili smo otopine i tretirali stanice tako da su konačne koncentracije na stanicama iznosile redom 0 μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 75 μM i 100 μM HNE-a. Za testove GSH, katalaze i proteina, iz matične otopine HNE-a pripremili smo radnu koncentraciju HNE-a od 60 μM te tretirali stanice tako da je konačna koncentracija na stanicama iznosila 10 μM.

#### 4.4 Oblaganje kolagenom i tretman kolagena HNE-om

Nakon što smo kolagen otopili u razrijeđenoj 50 mM octenoj kiselini do finalne koncentracije od 1 mg/ml, priredili smo tri otopine. U prvu smo stavili kolagen i destiliranu vodu do finalne koncentracije 5 μg/ml. U drugu smo stavili 5 μg/ml kolagena i 1 μM HNE-a u destiliranoj vodi. Treća otopina se sastojala od 5 μg/ml kolagena i 10 μM HNE-a. U tri pločice od po 6 jažica, pipetirali smo 2,5 ml svake otopine. Pločice su ostavljene na sušenju preko noći u kabinetu s laminarnim protokom. Nakon što je tekućina ishlapila, a kolagen ostao na dnu jažice, pločice su sterilizirane 20 min pod UV svjetlom prije upotrebe. Na slici br. 1 prikazana je shema naše pločice.

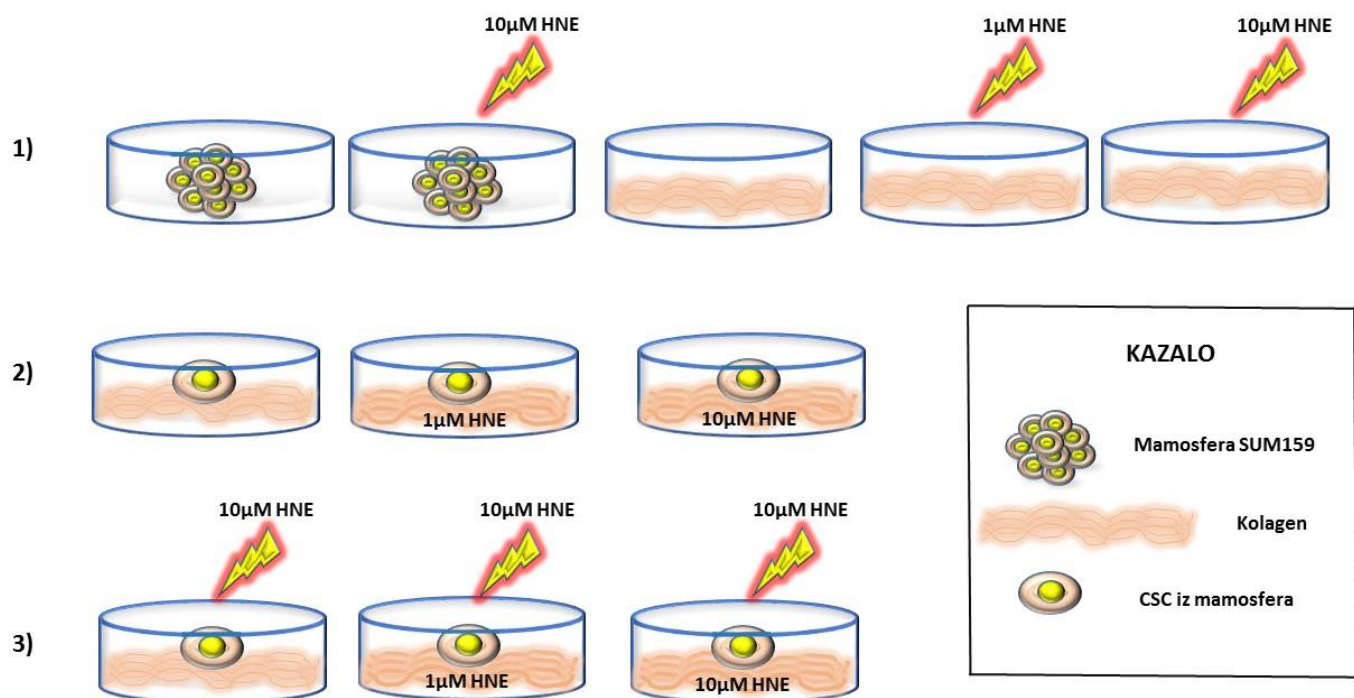
kolagen	kolagen + 1 μM HNE	kolagen + 10μM HNE	PS
<b>kontrola</b>	<b>kontrola</b>	<b>kontrola</b>	<b>kontrola</b>
kolagen	kolagen + 1 μM HNE	kolagen + 10μM HNE	PS
<b>HNE</b>	<b>HNE</b>	<b>HNE</b>	<b>HNE</b>

Slika 2. Shema pločica (PS- polistiren)



#### 4.5 Tretman stanica

Mamosfere smo tripsinizirali TrypLE-om (Gibco). Nakon što smo sfere dezintegrirali i dobili suspenziju pojedinačnih stanica, gustoću stanica odredili smo bojanjem tripanskim modrilom i brojanjem na hemocitometru. Za MTT test i test ugradnje  $^3\text{H}$ -timidina, nasadili smo stanice u mikrotitarske pločice u gustoći od 10 000 stanica u volumenu od 200  $\mu\text{l}$ . Stanice smo ostavili 3h da se zalijepe te smo ih tretirali koncentracijama HNE-a redom 0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ . Nakon inicijalnog tretmana, svaki drugi dan mijenjali smo medij stanicama. Adheriranim stanicama odvadili smo medij i tretirali ih svježim medijem ili svježe pripremljenim otopinama HNE-a kako je navedeno. Mamosfere smo centrifugirali i resuspendirali u svježem mediju, kontrolnom ili otopinama 0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  HNE-a. Ovo smo ponavljali tijekom 10 dana.



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz desetodnevnog pokusa nakon kojeg su uslijedila mjerenja GSH, katalaze i proteina.

CSC- matične stanice karcinoma (cancer stem cells), HNE- 4-hidroksinonenal

Za eksperimente određivanja katalaze, GSH, i proteina, stanice smo razrijedili i nasadili 250 000 stanica u volumenu od 3 ml po jažici. Stanice smo ostavili 3 h da adheriraju. Nakon inicijalnog tretmana, svaki drugi



dan zamijenili smo medij stanicama. Adheriranim stanicama odvadili smo medij i tretirali ih svježim medijem i svježe pripremljenom otopinom 10  $\mu$ M HNE-a, dok smo mamosfere cetrifugirali i resuspendirali u svježem mediju, kontrolnom ili 10  $\mu$ M HNE-om. Deseti dan, završili smo tretman i stanice smo tripsinizirali TrypLE-om (Gibco), centrifugirali, odlili supernatant, a suhi talog pohranili na  $-80^{\circ}\text{C}$  do analize.

#### 4.6 MTT test

Kako bismo odredili vijabilnost stanica i kolagena, proveli smo MTT test. Koristili smo EZ4U MTT test (Biomedica, Austrija). Boju za mjerenje smo pripremili na način da smo neposredno prije upotrebe otopili supstrat u 2,5 ml aktivatorske otopine. Prije samog nanošenja u pločicu, zagrijali smo otopinu na  $37^{\circ}\text{C}$ . Stanice smo pripremili na prethodno opisan način. 10-tog dana nakon nasađivanja, na uzorke smo dodali 20  $\mu$ l boje koje smo prethodno pripremili i inkubirali 2h na  $37^{\circ}\text{C}$ . Nakon inkubacije, pločicu smo protresli i izmjerili apsorbanciju na 450 nm.

#### 4.7 Test ugradnje $^3\text{H}$ -timidina

Stanice smo nasadili u mikrotitarsku pločicu pri gustoći od 10 000 stanica po jažici u ukupnom volumenu od 200  $\mu$ L te su tretirane na prethodno navedeni način. Dodali smo  $^3\text{H}$ -timidin (1  $\mu\text{Ci}$ /jažici, Amersham, SAD) 9. dan eksperimenta te je inkubacija nastavljena tokom sljedeća 24h. Nakon isteka inkubacije prebacili smo stanice na filter pomoću Skatron skupljača stanica, te smo razinu ugradnje timidina očitali na  $\beta$ -scintilacijskom brojaču (Beckman, LS 3800 Series). Budući da je za rad s radioaktivnim izvorima zračenja potrebna posebna dozvola, ovim putem se najljubaznije zahvaljujemo dr.sc. Lidiji Milković na izvođenju ovog eksperimenta.

#### 4.8 Ukupni glutation

Kako bismo kvantificirali antioksidacijsku zaštitu u matičnim stanicama karcinoma dojke uzgajanih u različitim uvjetima podloge i stresa, mjerili smo ukupni glutation (GSH), jedan od najvažnijih endogenih antioksidansa. Odredili smo baždarnu krivulju iz serije razrjeđenja 10 mM GSH. Prethodno zamrznuti talog smo otopili. Zatim smo lizirali stanice tako da smo ih četiri puta uzastopno odmrzavali i smrzavali, a nakon svakog odmrzavanja smo snažno promiješali. Nakon toga, centrifugirali smo stanice na 13,4 rpm kroz 10 min. Nakon liziranja, izmjerili smo koncentraciju proteina metodom po Bradfordu (27) te smo koncentraciju proteina podesili na 0,03 mg/ml. Nakon što smo sve pripremili, nakapali smo po 150  $\mu$ l standarda i uzoraka u mikrotitarsku pločicu u triplikatima. Neposredno prije kapanja, pomiješali smo Ellmanov reagens, GSH reduktazu i NADPH u omjeru 1:1:1 te smo tako 75  $\mu$ l pripremljene smjese, nakapali na uzorke i odmah očitali apsorbanciju na 405 nm, zatim nakon 3 i 5 min.

#### 4.9 Katalaza

Stanice smo lizirali kako je opisano pod poglavljem GSH, a količina proteina također je određena metodom po Bradfordu (27). Odredili smo baždarnu krivulju iz serije razrjeđenja vodikovog peroksida koji služi kao mjera koncentracije nerazgrađenog vodikovog peroksida u uzorku. Nakapali smo 65mM vodikovog peroksida na sve uzorke te smo izmjerili pozadinsku vrijednost. Potom smo uzorke inkubirali 5 minuta, a nakon toga dodali smo 200 mM amonij molibdata. Nakon što smo očitali absorbanciju (405nm), aktivnost katalaze izračunali smo kao jedinica po masi proteina (U/mg proteina) u uzorku.

#### 4.10 Kapljična analiza proteina

Pripremili smo uzorke na prethodno navedeni način te smo izračunali koncentraciju proteina u uzorku metodom po Bradfordu (27). Na membranu, prethodno aktiviranu u destiliranoj vodi i ispranoj PBS-om nanijeli smo 10 µg uzorka. Membranu smo potom ponovno isprali PBS-om te smo ju inkubirali u 2% nemasnom mlijeku u prahu (otopljenim u PBS-u) na sobnoj temperaturi tijekom 60 minuta kako bi se blokirala slobodna mjesta bez proteina. Preko noći, inkubirali smo membranu protutijelima anti-Nrf2 (1:100; Santa Cruz, SAD) i anti-HNE (1:10 ustupljeno ljubaznošću dr. sc. Georga Waega). Sljedeći dan, inkubirali smo membranu s 1.5% otopinom vodikova peroksida u 3% BSA (od eng. Bovine serum albumin) u PBS-u radi blokiranja endogenih peroksidaza. Membranu smo ispirali puferom i inkubirali sekundarnim protutijelom EnVision (1:25; Dako, Denmark) tijekom 30 minuta. Vizualizirali smo imunokomplekse upotrebom otopine 3,3'- diaminobenzidin tetrahidroklorida (DAB, Dako, Danska). Nakon toga smo skenirali membrane i signal kvantificirali ImageJ programom.

#### 4.11 Western blot

Kako bismo potvrdili specifičnost protutijela anti-Nrf2 i rezultate dobivene kapljičnom analizom proteina, napravili smo analizu proteina Western blotom. Stanice smo priredili kako je gore navedeno. Koncentraciju proteina izmjerili smo metodom po Bradfordu (27). Uzorke s 21 µg proteina nakapali smo na 10% poliakrilamidni gel te smo ih razdvojili u električnom polju napona 180 V tijekom 50 min. Nakon odvajanja na gelu, proteine smo prebacili na PVDF (od eng. polyvinylidene difluoride) membranu (promjer pora 0,2 µm) u električnom polju. Koristili smo tzv. „suhi“ sistem za transfer do membrane iBlot (Thermo Fisher Scientific, SAD) po uputstvima proizvođača. Nakon što su proteini prebačeni na membranu, inkubirali smo membranu u otopini za blokiranje (1% nemasno mlijeko u prahu otopljeno u PBS-u) na sobnoj temperaturi tijekom 60 min. Inkubirali smo membranu protutijelima na Nrf2 (1:100; Santa Cruz, SAD) preko noći. Sljedeći dan, inkubirali smo membranu s 1.5% otopinom vodikova peroksida u 3% BSA u PBS-u radi blokiranja endogenih peroksidaza. Membranu smo zatim ispirali puferom i inkubirali sekundarnim

protutjelom EnVision (1:25; Dako, Denmark) tijekom 30 minuta. Imunokomplekse smo vizualizirali luminolom (Clarity Max™ Western ECL substrate, BioRad, SAD). Signal na membrani skenirali smo UVItec Alliance 4.3 (Cambridge, UK) aparatom, a signal kvantificirali u ImageJ programu.

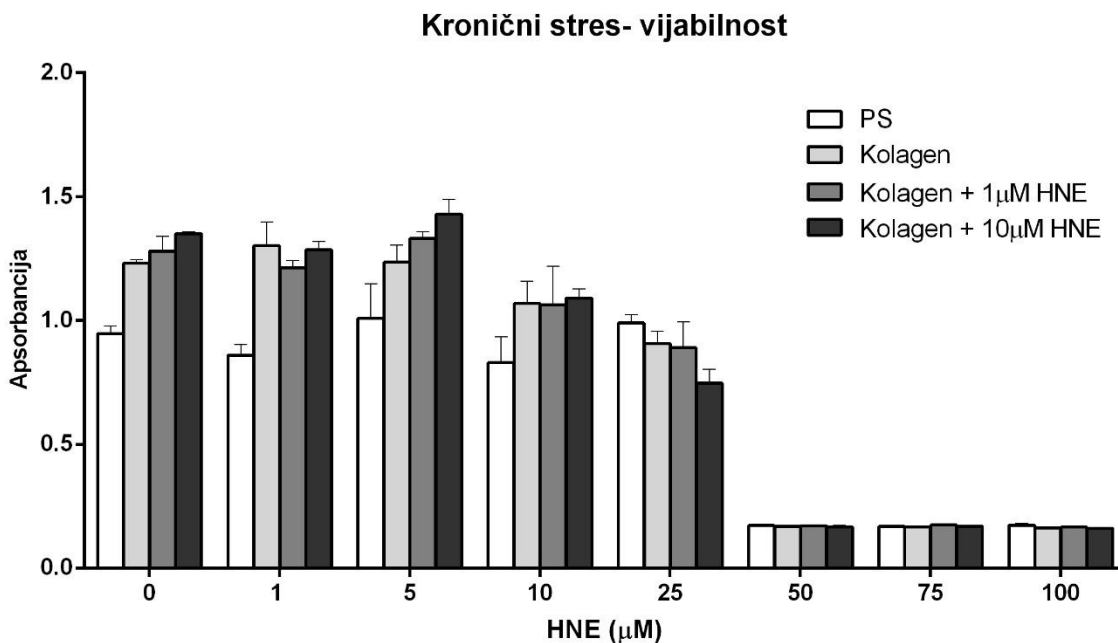
#### 4.12 Statistička analiza

Uzorci su rađeni u biološkim i tehničkim triplikatima. Za statističku analizu u programu IBM SPSS 23 (New York, SAD) korišten je studentov t-test za neovisne uzorke. Jednakost varijanci utvrđena je pomoću Levenova testa. IC50 (50% inhibitorna koncentracija) izračunata je nelinearnom regresijskom krivuljom logaritma inhibitora nasuprot normaliziranog odgovora i varijabilne krivulje najmanjeg kvadrata funkcije programa GraphPad Prism 5.0 (California, SAD).

## 5. REZULTATI

### 5.1 MTT TEST

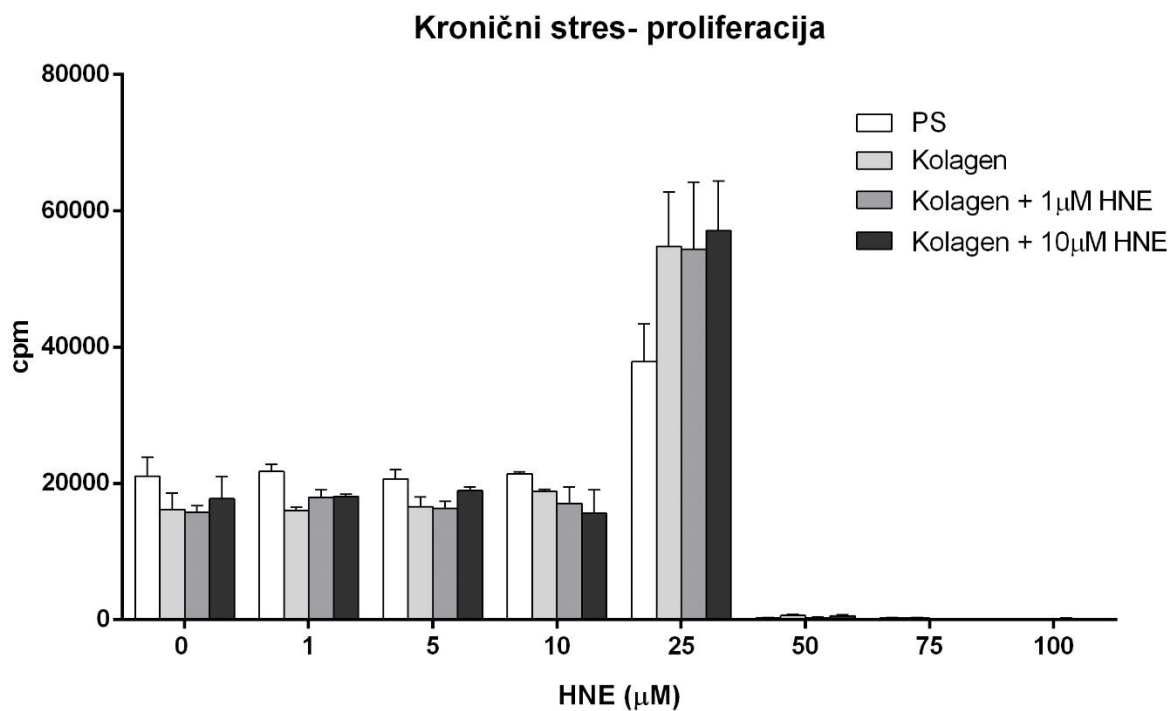
U prvoj skupini uzoraka mjerili smo vijabilnost stanica nasadenih na polistiren (PS), na netretirani kolagen, kolagen tretiran 1  $\mu\text{M}$  HNE-om i kolagen tretiran 10  $\mu\text{M}$  HNE-om. Vidjeli smo rast metaboličke aktivnosti, a najveća je bila na kolagenu tretiranom 10  $\mu\text{M}$  HNE-om i to 42,7% veća u odnosu na stanice na PS podlozi ( $p=0,004$ ). Do tretmana 10  $\mu\text{M}$  HNE-om, najmanja metabolička aktivnost bila je u stanicama na PS podlozi, dok su stanice na kolagenu (nativnom i HNE-om tretiranom) pokazivale veću razinu metaboličke aktivnosti. Statistička razlika uočena je za tretman 1  $\mu\text{M}$  HNE-om; 51.4% povećanje aktivnosti na kolagenu u odnosu na PS podlogu ( $p=0,014$ ), dok za tretman 5 i 10  $\mu\text{M}$  HNE-om postoji povećana aktivnost iako nije statistički značajna. Promjenu u trendu metaboličke aktivnosti uočili smo prilikom tretmana 25  $\mu\text{M}$  HNE-om gdje je najveća metabolička aktivnost izmjerena u stanicama na PS podlozi, a najmanja na kolagenu s 10  $\mu\text{M}$  HNE-om (24.5 % razlika;  $p=0,03$ ). Nismo uočili metaboličku aktivnost u tretmanima s 50, 75 i 100  $\mu\text{M}$  HNE-om



Slika 4. Utjecaj HNE-a na rast SUM159 nasadenima na različitim podlogama. Kao podloga korišteni su polistiren, nativni kolagen, kolagen s 1 µM HNE-om i s 10 µM HNE-om. Stanice su tretirane 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75 i 100 µM HNE-om tijekom 10 dana. Metabolička aktivnost stanica mjerena je MTT testom.

## 5.2 Test ugradnje <sup>3</sup>H-timidina

U svrhu kvantifikacije proliferacijskog potencijala stanica ovisno o podlozi i koncentraciji HNE-a, proveli smo test ugradnje radioaktivnog timidina (<sup>3</sup>H-timidin). U kontrolnim stanicama, stanicama tretiranim 1, 5 i 10 µM HNE-om postoji trend povećane proliferacije stanica na PS podlozi u odnosu na sve kolagenske podloge. Kao i u MTT mjerenju primijetili smo promjenu trenda prilikom tretmana 25 µM HNE-om. Sve grupe tretirane 25 µM HNE-om imaju povećanu proliferaciju u odnosu na prethodno spomenute tretmane. Stanice na PS podlozi, tretirane 25 µM HNE-om, imaju značajno nižu razinu proliferacije od stanica koje rastu na kolagenima (redom kolagen p=0,037, kolagen 1 µM HNE p=0,066 i kolagen 10 µM HNE p=0,042). Sumarno, inhibitorne koncentracije izračunate iz krivulja citotoksičnosti prikazane su u tablici 2. Vrijednosti izračunate iz testa proliferacije su vrlo slične zbog značajnog povišenja proliferacije u tretmanu s 25µM HNE-om. U stanicama tretiranim 50, 75 i 100 µM HNE-om možemo vidjeti potpunu inhibiciju proliferacije neovisno o podlozi.



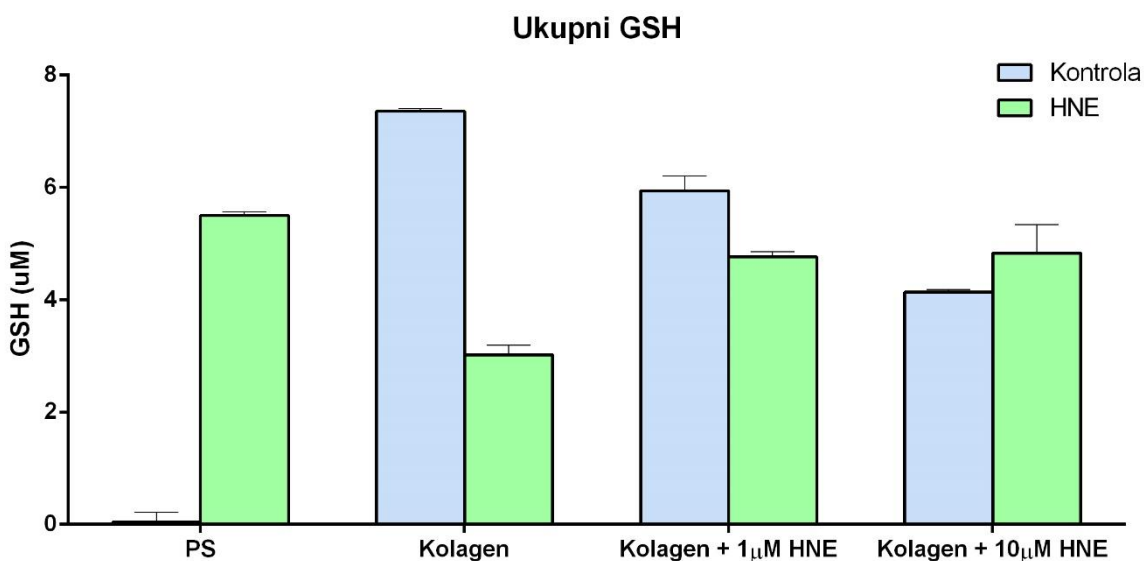
Slika 5. Utjecaj HNE-a na proliferaciju SUM159 na različitim podlogama. Kao podloga korišteni su polistiren, nativni kolagen, kolagen s 1  $\mu\text{M}$  HNE-om i kolagen s 10  $\mu\text{M}$  HNE-om. Stanice su tretirane 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75 i 100  $\mu\text{M}$  HNE-om tijekom 10 dana. Proliferacija stanica mjerena je testom ugradnje 3H-timidina. (cpm- counts per minute).

Tablica 2. 50% inhibitorne koncentracije za rast i proliferaciju SUM159 na različitim podlogama

PODLOGA	MTT	3-HT
PS	45.47	44.55
Kolagen	27.95	45.30
Kolagen + 1 $\mu\text{M}$ HNE	27.53	44.34
Kolagen + 10 $\mu\text{M}$ HNE	25.06	45.61

### 5.3 Glutation

Shodno rezultatima testa proliferacije i vijabilnosti, u daljnjim ekperimentima koristili smo tretman 10  $\mu$ M HNE-om koji je odabran kao suprafiziološka koncentracija koja se može naći u organizmu. Dugotrajno izlaganje HNE-u stanica na PS podlozi izrazito povisuje razinu GSH (  $p=0,006$ ). Podloga s kolagenom stimulira proizvodnju GSH u odnosu na PS podlogu. Na nativnom kolagenu stanice tretirane HNE-om imale su 144% manju razinu GSH (  $p=0,012$ ). Na kolagenu tretiranom 1  $\mu$ M HNE-om izmjerili smo manju razliku u GSH, no kontrolna skupina je imala 25% veću razinu glutaciona u odnosu na tretiranu (  $p=0,072$ ). Među našim zadnjim parovima, stanicama na kolagenu tretiranom 10 $\mu$ M HNE-om, stanice u nativnom mediju su pokazale 14% manji izražaj GSH od stanica nasadenih na jednako pripravljen kolagen i tretiranih 10  $\mu$ M HNE-om (  $p=0,304$ ). Vrijedi napomenuti da smo gotovo identičnu razinu GSH izmjerili u obje skupine stanica tretiranih HNE-om i nasadenim na modificirani kolagen.



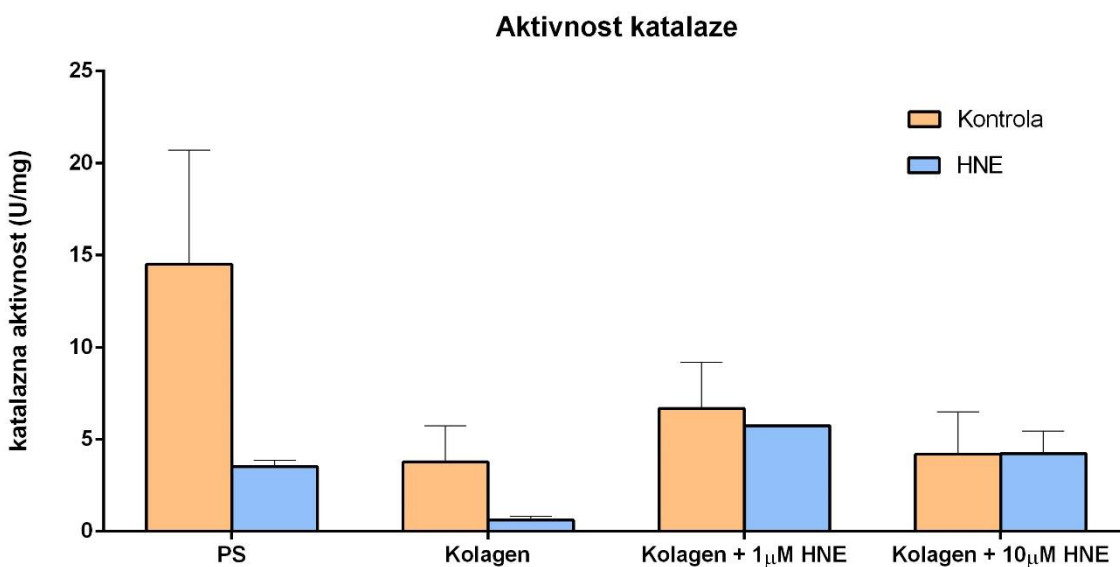
Slika 6. Utjecaj HNE-a na proizvodnju glutaciona u SUM159 nasadenima na različitim podlogama.

Kao podloge korišteni su polistiren, nativni kolagen, kolagen s 1  $\mu$ M HNE-om te kolagen s 10  $\mu$ M HNE-om. Stanice su uzgajane tijekom deset dana i dodatno tretirane 10  $\mu$ M HNE-om. Mjeren je i reducirani i oksidirani glutation.

### 5.4 Katalaza

Mjerenja aktivnosti katalaze u stanicama na PS podlozi pokazala su četverostruko veću aktivnost u odnosu na sfere tretirane 10  $\mu$ M HNE-om (  $p=0,053$ ). Također, među netretiranim stanicama na PS podlozi, izmjerili smo i ukupno najveću aktivnost katalaze. Kod stanica na nativnom kolagenu zabilježili smo 6 puta veću

aktivnost katalaze u netretiranim u odnosu na stanice tretirane HNE-om ( $p=0,059$ ). U stanicama na kolagenu s  $1\mu\text{M}$  HNE-om izmjerili smo blago povišenu aktivnost katalaze u stanicama koje nisu tretirane  $10\mu\text{M}$  HNE-om u odnosu na tretirane, bez statističke značajnosti. U stanicama na kolagenu tretiranom  $10\mu\text{M}$  HNE-om, nismo primijetili razlike u aktivnosti katalaze. Dok je nasadivanje sfera na nativni kolagen pozitivno utjecalo na razinu GSH, efekt na aktivnost katalaze je bio suprotan, preciznije izmjerili smo četverostruki pad aktivnosti katalaze ( $p=0,037$ ). Rast na kolagenu tretiranom  $1\mu\text{M}$  HNE, pozitivno se odrazio na aktivnost katalaze u odnosu na stanice na nativnom kolagenu u skupinama koje nismo izlagali kroničnom stresu ( $p=0,031$ ). Opisani obrazac je bio još izraženiji među stanicama izloženim kroničnom stresu, tj. desetodnevnom tretmanu HNE-om. U dotičnim skupinama je zabilježen deveterostruki i šesterostruki porast aktivnosti katalaze u odnosu na stanice na nativnom kolagenu izložene kroničnom stresu ( $p=0,004$  i  $p=0,03$ ).



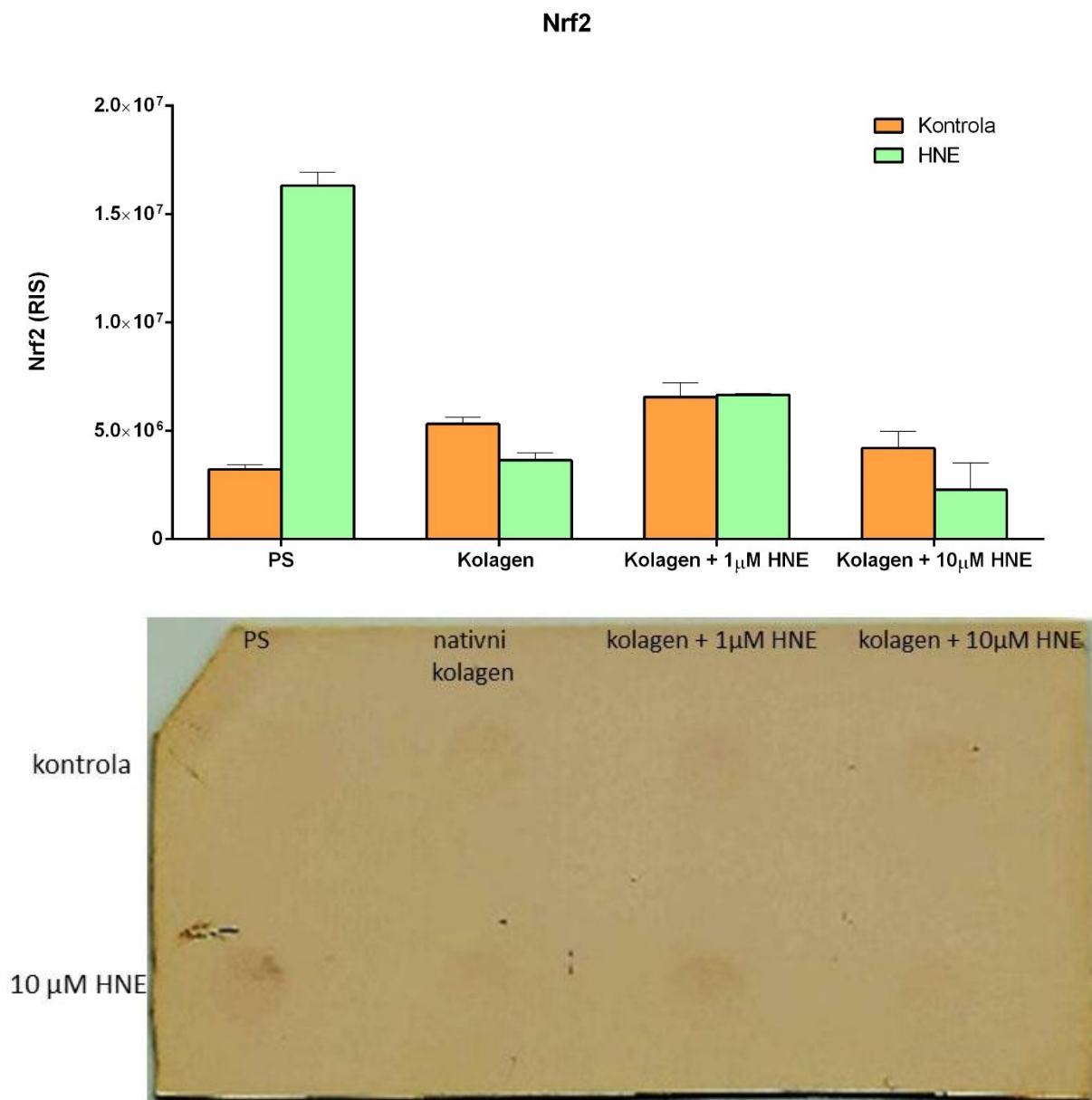
Slika 7. Utjecaj HNE-a na aktivnost katalaze u SUM159 nasadenima na različitim podlogama. Kao podloge korišteni su polistiren, nativni kolagen, kolagen s  $1\mu\text{M}$  HNE-om te kolagen s  $10\mu\text{M}$  HNE-om. Stanice su uzgajane tijekom 10 dana i dodatno tretirane  $10\mu\text{M}$  HNE-om.

### 5.5 Kapljična analiza proteina

#### Količina transkripcijskog faktora Nrf2

Dugotrajno izlaganje HNE-u stanica na PS podlozi izrazito povisuje količinu Nrf2 ( $p=0,001$ ). Na podlogama s kolagenom vidi se trend povećanja količine Nrf2 bez obzira na tretman kolagena HNE-om. Na nativnom kolagenu, stanice tretirane HNE-om imale su 40% nižu razinu Nrf2 proteina ( $p=0,037$ ). Na kolagenu tretiranom  $1\mu\text{M}$  HNE-om i kolagenu tretiranom  $10\mu\text{M}$  HNE-om nema statistički značajne razlike

u količini transkripcijskog faktora Nrf2 između kontrolne i HNE-om tretirane skupine. Stanice na kolagenu s 1 $\mu$ M HNE-om imaju statistički značajan porast Nrf2 u odnosu na stanice na nativnom kolagenu (p=0,007).



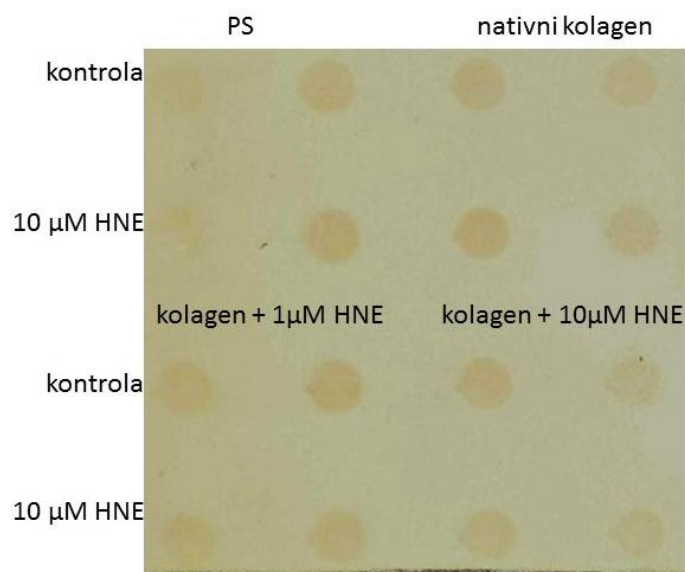
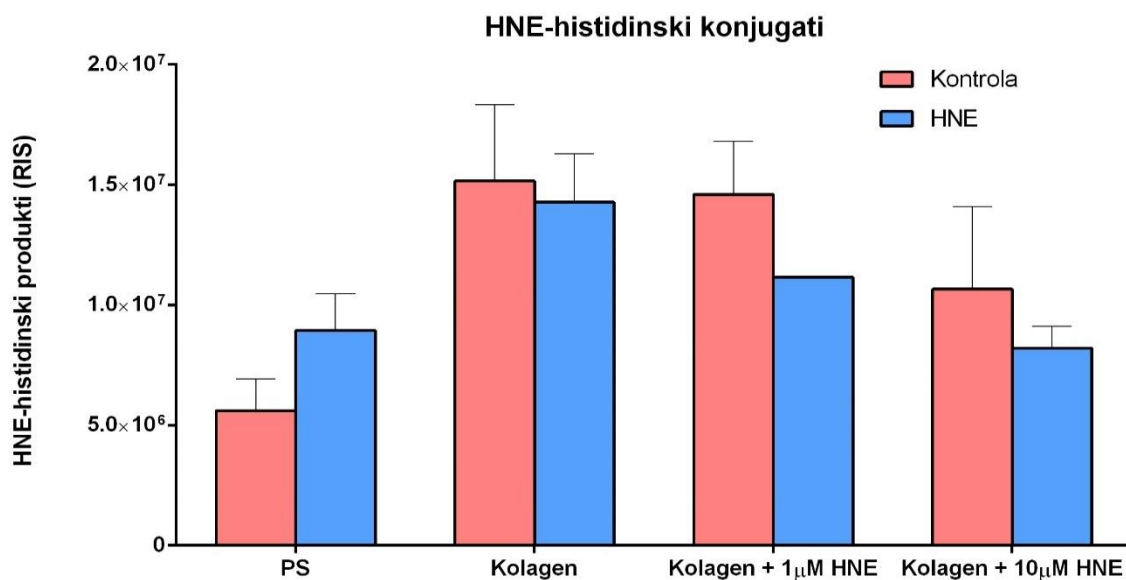
Slika 8. Kapljična analiza transkripcijskog faktora Nrf2.

Količina Nrf2 proteina u staničnoj liniji SUM159 na različitim podlogama. (RIS – relativni intenzitet signala).



## HNE-histidinski konjugati

Dugotrajno izlaganje HNE-u stanica na PS podlozi, značajno povisuje količinu HNE-histidinskih konjugata. Rast na podlogama s kolagenom povećava stvaranje HNE-histidinskih konjugata u stanicama u odnosu na PS podlogu. U odnosu na stanice na nativnom kolagenu, u stanicama na kolagenskim podlogama s HNE-om manja je količina HNE histidinskih konjugata.

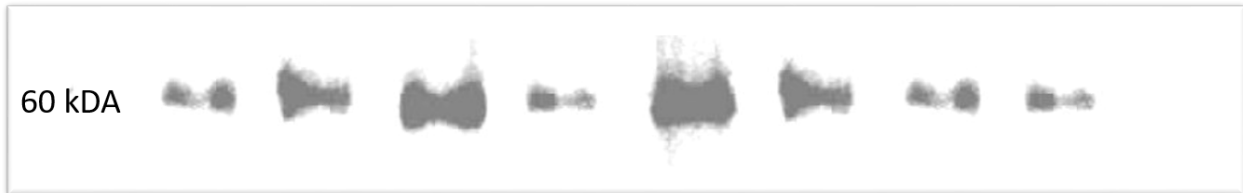


Slika 9. **Kapljična analiza HNE-histidinskih konjugata.** Količina HNE-histidinskih konjugata u stanicama na različitim podlogama. Uzorci su na membranu nanesheni u duplikatima

## 5.6 WESTERN BLOT

Western blot analizom transkripcijskog faktora Nrf2, detektirali smo signal na približno 60 kDa što odgovara molekularnoj težini slobodnog Nrf2 proteina.

Western blot analizu HNE-histidinskih konjugata nismo provodili jer HNE stvara konjugate s histidinom na mnogim staničnim proteinima te zbog toga ne bi dobili adekvatan signal.



Slika 10. Western blot membrana- Nrf2

## 6. RASPRAVA

Tumor dojke je jedan od glavnih uzroka smrtnosti žena u svijetu (1), za što je odgovorno stvaranje metastaza. Budući da su za stvaranje metastaza odgovorne tumorske matične stanice, odlučili smo se za staničnu liniju karcinoma dojke SUM159 koja formira mamosfere u kojima se potencira rast stanica koje ekspimiraju CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>/ESA<sup>+</sup> (26). To je linija trostruko negativnog karcinoma dojke koji je ujedno i najmaligniji, s najlošijom prognozom. Mamosfere imaju organoidnu strukturu te kao takve simuliraju izgled i ponašanje karcinoma dojke u organizmu. Sljedeće, kao podlogu za rast stanica koristili smo PS na koji stanice u uvjetima induciranja sfera ne adheriraju te kolagen budući da je on glavni građivni protein izvanstaničnog matriksa u zdravom, ali i u tumorski promijenjenom tkivu.

Kronični stres uzrokovali smo HNE-om, jednim od glavnih produkata lipidne peroksidacije i oksidacijskog stresa, konstantno prisutnih u organizmu (11). HNE je dugoživuća molekula sposobna modificirati DNA, ali i proteine pa tako i kolagen (12). U organizmu se u fiziološkim uvjetima može naći koncentracija HNE-a od 1 do 10  $\mu$ M.

Trostruko negativni karcinom dojke je izrazito agresivan tumor sposoban izbjeći sve obrambene mehanizme tijela. U liječenju trostruko negativnog karcinoma dojke koristi se neoadjuvantna kemoterapija bazirana na antraciklinima (doksorubicin/ciklofosfamid). Ovakva kemoterapija uzrokuje i izraziti oksidacijski stres u tumoru i u njegovom mikrokolišu, a time i smanjenje tumora. Premda trostruko negativni karcinom dojke prvotno izrazito dobro reagira na kemoterapiju, konačni ishod mu je svejedno lošiji od ostalih karcinoma dojke (28). Zapitali smo se može li uzrok tome biti prilagođavanje karcinoma na oksidacijski stres, osobito

kronični. Budući da se kemoterapija daje u dugotrajnim intervalima, simulirali smo kronični stres tretmanom HNE-om tijekom 10 dana, uz dodatnu modifikaciju kolagena.

MTT i test ugradnje  $^3\text{H}$ -timidina su komplementarni testovi koji mjere metaboličku aktivnost stanice i intenzitet proliferacije. Bitno je analizirati oba aspekta s obzirom da povećana metabolička aktivnost stanica ne znači i povećanu proliferaciju. MTT test je pokazao promjenu metaboličke aktivnosti stanica ovisno o podlozi na kojoj stanice rastu te u odnosu na koncentraciju HNE-a. Test ugradnje  $^3\text{H}$ -timidina ukazao je na smanjeni intenzitet proliferacije kod nižih koncentracija HNE-a, i izraziti porast s 25  $\mu\text{M}$  HNE-om. Promatrajući usporedno rezultate ova dva testa pokazalo se da koncentracije HNE-a iznad 50  $\mu\text{M}$  inhibiraju i metaboličku aktivnost stanica i njihovu proliferaciju. Ovako visoke koncentracije HNE-a su izrazito toksične te ih se ne nalazi ni u fiziološkim, ni u patološkim uvjetima u organizmu. Zanimljiva pojava se dogodila kod tretmana stanica 10 i 25  $\mu\text{M}$  HNE-om. Prilikom tretmana stanica 10  $\mu\text{M}$  HNE-om metabolička aktivnost je počela opadati neovisno o podlozi, dok je proliferacija stagnirala. Pri tretmanu stanica 25  $\mu\text{M}$  HNE-om metabolička aktivnost stanica se dodatno snizila, ali je proliferacija značajno porasla. Smatramo da je metabolička aktivnost stanica rasla do tretmana koncentracije od 10  $\mu\text{M}$  HNE-a zbog prilagodbe stanica, ali je proliferacija stagnirala zbog ispunjenosti podloge. Pri koncentracijama HNE-a od 25  $\mu\text{M}$  HNE-a metabolička aktivnost stanica se značajno smanjila, ali uz dovoljno prostora intenzitet proliferacije je porastao. Naime, mamosfere su trodimenzionalne strukture, u kojima su stanice posložene u više slojeva te je logično za očekivati da će stanice na površini takve strukture biti izložene stresu i HNE-u nego stanice u dubljim slojevima. Nažalost, kemoterapijom ne možemo specifično ciljati slojeve stanica pa stanice u dubljim slojevima ostaju „zaštićene“ stanicama na površini te se i pri vrlo visokim koncentracijama HNE-a od 25  $\mu\text{M}$  nastavljaju dijeliti.

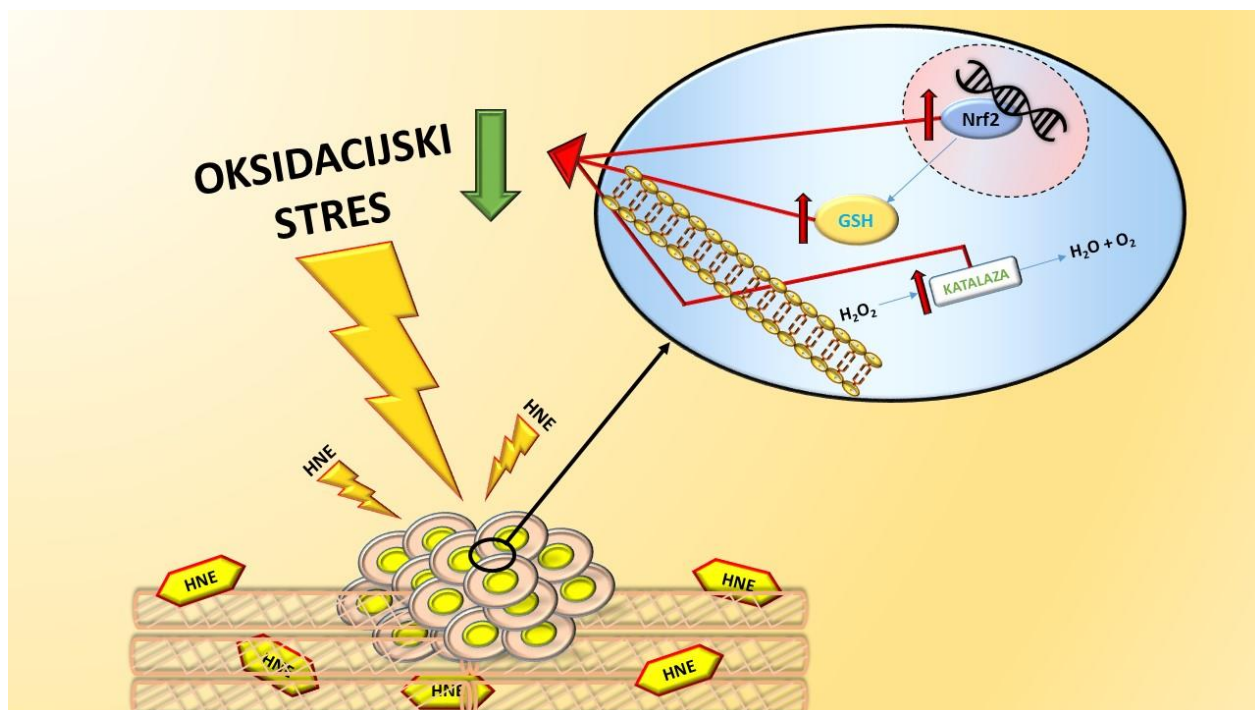
Kako je GSH glavni zaštitnik stanica od toksičnih učinaka HNE-a i najvažniji neenzimatski antioksidans stanica, odlučili smo mjeriti utjecaj kroničnog tretmana stanica i modifikacija kolagenskih podloga na koncentraciju ukupnog GSH. U stanicama na PS-u izmjerili smo vrlo niske razine GSH. Veliki porast smo izmjerili u stanicama na PS-u tretiranim 10  $\mu\text{M}$  HNE-om. Fenotip matičnih stanica, među ostalim, odlikuje i sposobnost brze sinteze GSH, djelomično zbog činjenice da je njihov površinski marker CD44 ujedno i stabilizator cistin-glutamatnog transportera XCT (10). Zanimljivu pojavu uočili smo u stanicama na nativnom kolagenu gdje je sam desetodnevni rast uzrokovao najviše koncentracije GSH u našem pokusu. Koncentracija GSH u stanicama na kolagenu tretiranom 1  $\mu\text{M}$  HNE-om bila je značajno niža od one u stanicama na nativnom. Trend snižavanja koncentracije GSH je nastavljen i u netretiranim stanicama na kolagenu s 10  $\mu\text{M}$  HNE. Iznenadjuće, u stanicama na modificiranim kolagenskim podlogama koje su izložene kroničnom stresu nije uočena ista pojava. Usprkos činjenici da je GSH ovisni sustav glavni put metabolizma HNE-a, i što bi očekivali da se GSH „potroši“ slično kao u tretiranim stanicama na nativnom

kolagenu, u tretiranim stanicama koje su rasle na kolagenu s 1 i 10  $\mu\text{M}$  HNE-om zabilježeno je povećanje koncentracije GSH. Sljedeća vrlo bitna komponenta antioksidacijskog sustava je katalaza, enzim s najvećim obrtajnim brojem. Mjerenjem aktivnosti katalaze u stanicama na PS-u primijećeno je da je upravo to njihov glavni mehanizam antioksidacijske obrane u odsustvu stresa. I dok je rast stanica na nativnom kolagenu povećao razinu GSH, aktivnost katalaze se smanjila. Rast stanica na kolagenu tretiranom 1 i 10  $\mu\text{M}$  HNE-om povećao je aktivnost katalaze, a opisana je pojava još izraženija kad se usporede stanice izložene kroničnom stresu, tj. desetodnevnom tretmanu HNE-om. Potonje je još zanimljivije kada znamo da katalaza nema ulogu u metabolizmu HNE-a. S obzirom na zabilježeni porast GSH, kao logičan korak nametnula se kvantifikacija transkripcijskog faktora Nrf2 odgovornog za transkripciju gena antioksidacijskog sustava. Nrf2 je jedan od glavnih regulatora odgovora stanica na oksidacijski stres. Učinci Nrf2 očituju se povećanom sintezom glutamat-cistein ligaze, ključnog koraka u sintezi GSH (13). Osim toga, Nrf2 stimulira sintezu SCL7A11 poznatijeg kao XCT, glutamat-cistinog transportera (10). Potonjim se unosi cistin u stanicu, cistin biva reduciran i potom uporabljen u sintezi GSH, ili u aktivnom mjestu brojnih antioksidacijskih enzima poput glutation i tioredoksin peroksidaze (23). U stanicama na PS podlozi tretiranim 10  $\mu\text{M}$  HNE-om izmjerena je najviša razina Nrf2. Taj rezultat je u skladu s koncentracijom GSH, ali obzirom na jako visoku razinu Nrf2 u usporedbi sa stanicama na drugim podlogama, postavlja se pitanje radi li se samo o visokom obrtaju Nrf2 koji biva sintetiziran i ubrzo ubikvitiran od strane Keap1-Cul3 ubikvintin ligaznog sustava. Kako bi razjasnili, napravili smo Western blot analizu, gdje se slobodni Nrf2 detektira na 60-65 kDa molekularne težine, a ubikvitinirani, koji se upućuje na degradaciju u proteasomu na oko 110 kDa (18). Nrf2 u našem sustavu nalazio se na 60 kDa pa je detektirano povećanje rezultat povećane količine aktivnog transkripcijskog faktora. Zanimljivo je da smo među kolagenskim podlogama relativno najniže razine Nrf2 izmjerili u stanicama na kolagenu tretiranom 10  $\mu\text{M}$  HNE-om. Uzimajući u obzir da koncentracije GSH u stanicama na kolagenu tretiranom 10  $\mu\text{M}$  HNE-om nisu bile toliko niže koliko sugerira razina Nrf2, postavlja se pitanje je li ta kolagenska podloga tretirana HNE-om koji je na gornjoj granici fizioloških koncentracija uzrokovala trajnu prilagodbu stanica. Visoki obrtaj transkripcijskog faktora ne znači ujedno i višu transkripcijsku aktivnost potonjeg. Poznato je da Nrf2 veliki dio svojih učinaka ostvaruje uplitanjem u metabolizam stanica. Sintezom G6PD postiže se skretanje glukoze u pentoza fosfatni put i redukcija NADPH, koji je ključan kofaktor u redukciji tj. regeneraciji unutarstaničnog glutaciona (iz GSSG u GSH) (10). Osim G6PD, Nrf2 regulira ekspresiju i preostala 3 stanična enzima putem čijeg djelovanja nastaje NADPH: malični enzim 1 (ME1), 6-fosfoglukonat dehidrogenazu (PGD), izocitrat dehidrogenazu 1 (IDH1) (25). Smatramo da su ti mehanizmi, uz povećanu transkripcijsku aktivnost i dulji vijek Nrf2 u jezgri, doprinijeli povećanom antioksidacijskom kapacitetu stanica.

Potvrdu naše pretpostavke možemo naći i u rezultatima kapljične analize proteina na HNE-histidinske konjugate. Količina HNE-histidinskih konjugata kod tretmana stanica na PS-podlozi bila je veća nego na

netretiranim stanicama što je i za očekivati. Međutim, uspoređujući s količinom Nrf2 proteina u istoj skupini nije očekivan veći porast konjugata. Potonje možemo tumačiti činjenicom da stanice na PS-u, tj. sfere budući da imaju trodimenzionalnu strukturu ne primaju jednaku količinu HNE-a u svim slojevima te pretpostavljamo stanice u dubljim slojevima imaju manje HNE-histidinskih konjugata nego stanice na površini koje su izložnije tretmanu. U stanicama na kolagenu tretiranom različitom koncentracijom HNE-a možemo vidjeti trend opadanja količine HNE-histidinskih konjugata i to što je veća koncentracija HNE-a u podlozi to je manja količina HNE-histidinskih konjugata. Iako bi se očekivalo upravo suprotno, da dodavanjem HNE-a na podlogu raste količina HNE histidinskih konjugata. Objašnjenje ove pojave možemo tražiti u drugim čimbenicima, koji nisu ispitani u okviru ovog eksperimenta, koje aktivira modifikacija izvanstaničnog matriksa oksidacijskim stresom.

Svakako, naši rezultati ukazuju da su modifikacije izvanstaničnog matriksa produktima lipidne peroksidacije koje nastaju tijekom kroničnog oksidacijskog stresa važan čimbenik u prilagodbi tumorskih stanica na kronični stres. Nadamo se da će daljnja istraživanja u ovom smjeru razjasniti utjecaj terapije na generiranje malignih stanica tijekom liječenja primarnog tumora.



Slika 11. Grafički sažetak rada.

Oksidacijski stres uzrokuje stvaranje HNE-a koji modificira izvanstanični matriks i stanice mamosfera. Inducira se Nrf2 put koji vodi stanice mamosfera u prilagodbu na kronični stres. GSH- glutation, Nrf2- nuclear-factor erythroid 2-related factor 2

## 7. ZAKLJUČCI

Koncentracije HNE-a od 50  $\mu\text{M}$  na više inhibiraju metaboličku aktivnost i proliferaciju.

IC<sub>50</sub> za HNE u svim stanicama na različito pripremljenim kolagenskim podlogama je oko 25  $\mu\text{M}$ , dok za PS ona iznosi oko 45  $\mu\text{M}$ .

HNE u koncentraciji od 25  $\mu\text{M}$  izrazito stimulira proliferaciju na svim podlogama.

Rast stanica na kolagenu stimulira proizvodnju glutationa, rast u sferama ne stimulira proizvodnju GSH osim ako su stanice kronično izložene HNE-u.

Sfere imaju izrazito visoku katalaznu aktivnost koju tretman HNE-om smanjuje.

Stanice na nativnom kolagenu imaju nižu razinu katalazne aktivnosti koju kronični tretman HNE-om dodatno smanjuje. HNE na kolagenu povisuje katalaznu aktivnost u stanicama koja kronični tretman HNE-om ne mijenja.

Rast stanica na kolagenu uzrokuje porast količine Nrf2 proteina u stanicama. U odnosu na stanice u sferama, kronični stres HNE-om uzrokuje porast količine Nrf2 proteina.

Kronični tretman HNE-om u uvjetima stvaranja sfera povećava količinu HNE-histidinskih produkata dok na kolagenskim podlogama smanjuje stvaranje istih.

## 8. ZAHVALE

Ovim putem bismo se posebno zahvalili dr. sc. Ani Čipak Gašparović na strpljenju i trudu u učenju te na predanosti poslu. Također, željeli bismo se zahvaliti dr. Lidiji Milković na izvođenju pokusa ugradnje <sup>3</sup>H-timidina. Hvala čitavom osoblju Laboratorija za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković na srdačnosti, kolegijalnosti i uvijek dobrom raspoloženju. Bez svih vas, ovaj rad bismo teško obavili ovako uspješno.

## 9. POPIS LITERATURE

1. S. Babić, A. Borovečki, O. Brborović, D. Durut Beslač, A. Džakula, M. Grba-Bujević, D. Gvozdanić, A. Ivičević Uhernik, I. Josipović, V. Jureša, K. Lončarek, M. Majer MM. Organizacija zdravstvene zaštite i zdravstvena ekonomika
2. Hrvatske R. Registar za rak Republike Hrvatske Croatian National Cancer Registry INCIDENCIJA RAKA U HRVATSKOJ. 2015;(38).
3. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL (Stanley L. Robbins basic pathology. Elsevier/Saunders; 2013. 910 p.
4. Santagata S, Thakkar A, Ergonul A, Wang B, Woo T, Hu R, et al. Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome. 2014;124(2).
5. Hadden JW. Review Article The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update. Int J Immunopharmacol [Internet]. 1999;21(2):79–101.
6. Benito A, Clarke MF, Al-hajj M, Wicha MS, Benito-hernandez A, Morrison SJ, et al. breast ... Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. 2003;(May 2014).
7. Castaño Z, Fillmore CM, Kim CF, McAllister SS. The bed and the bugs: interactions between the tumor microenvironment and cancer stem cells. Semin Cancer Biol. 2012 Oct;22(5–6):462–70.

8. Fessler E, Dijkgraaf FE, Melo FDSE, Medema JP. Cancer stem cell dynamics in tumor progression and metastasis : Is the microenvironment to blame ? *Cancer Lett* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2013;341(1):97–104.
9. Cipak A, Mrakovcic L, Ciz M, Lojek A, Mihaylova B, Goshev I, et al. Growth suppression of human breast carcinoma stem cells by lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal and hydroxyl radical-modified collagen. 2010;57(2):165–71.
10. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. Nature Publishing Group; 2013;12(12):931–47.
11. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak a, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*. 2010;44(10):1098–124.
12. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res*. 2003 Jul;42(4):318–43.
13. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S, Ayala A, Munoz MF, Arguelles S, et al. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014(May 2014):1–31.
14. McElhanon KE, Bose C, Sharma R, Wu L, Awasthi YC, Singh SP. Gsta4 Null Mouse Embryonic Fibroblasts Exhibit Enhanced Sensitivity to Oxidants: Role of 4-Hydroxynonenal in Oxidant Toxicity. *Open J apoptosis*
15. Awasthi S, Sharma R, Singhal SS, Zimniak P, Awasthi YC. RLIP76, a novel transporter catalyzing ATP-dependent efflux of xenobiotics. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 2002 Dec;30(12):1300–10.
16. Huang Y, Li W, Kong A-NT. Anti-oxidative stress regulator NF-E2-related factor 2 mediates the adaptive induction of antioxidant and detoxifying enzymes by lipid peroxidation metabolite 4-hydroxynonenal. *Cell Biosci*
17. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonenn AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*. Elsevier; 2013;1(1):45–9.
18. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*. 2011;16(2):123–40.
19. Elstrodt F, Hollestelle A, Nagel JHA, Gorin M, Wasielewski M, Van Den Ouweland A, et al. BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer*



Res. 2006;66(1):41–5.

20. Gorrini C, Baniasadi PS, Harris IS, Silvester J, Inoue S, Snow B, et al. BRCA1 interacts with Nrf2 to regulate antioxidant signaling and cell survival. *J Exp Med*. 2013;210(8):1529–44.
21. Oommen D, Yiannakis D, Jha AN. BRCA1 deficiency increases the sensitivity of ovarian cancer cells to auranofin. *Mutat Res*;784–785:8–15.
22. Birben E, Murat U, Md S, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO J*. 2012;5(January):9–19.
23. Gašparović AČ, Lovaković T, Žarković N. Oxidative stress and antioxidants: Biological response modifiers of oxidative homeostasis in cancer. *Period Biol*. 2010;112(4):433–9.
24. Glorieux C, Dejeans N, Sid B, Beck R, Calderon PB, Verrax J. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(10):1384–90.
25. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci*. Elsevier Ltd; 2014;39(4):199–218.
26. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*. 2003 Oct;36 Suppl 1:59–72.
27. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. 1976;254:248–54.
28. Anders CK, Carey LA. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2009 Jun;9:S73–81.

## 10. SAŽETAK

Autori: Josip Vrančić, Iskra Pezdirc

Naslov: Oksidacijske modifikacije izvanstaničnog matriksa induciraju Nrf2 u matičnim stanicama karcinoma dojke

Oksidacijski stres je važan čimbenik u karcinogenezi, a uzrok povećanog oksidacijskog stresa u tumoru mogu biti radioterapija, kemoterapija i upala. Krajnji produkt lipidne peroksidacije, reaktivni aldehid 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), smatra se drugim glasnikom oksidacijskog stresa. HNE modificira metabolizam i signalne puteve tumorskih stanica promjenama aktivnosti proteina i reakcijama s lipidima i DNK. Uz oksidacijski stres, tumorske matične stanice su prepoznate kao ključni čimbenik zloćudnosti tumora i smatraju se odgovornima za nastanak metastaza, rezistenciju na terapiju i u konačnici relaps bolesti.

Stoga smo pratili utjecaj kroničnog oksidacijskog stresa i modulacije izvanstaničnog matriksa HNE-om na metabolizam, proliferaciju i promjenu u antioksidacijskim mehanizmima u tumorskim matičnim stanicama. Uočili smo da modifikacije izvanstaničnog matriksa mijenjaju reakcije stanica na kronični oksidacijski stres i bitno mijenjaju njihov rast, proliferaciju i antioksidacijske mehanizme poput glutationa, katalaze i transkripcijskog faktora Nrf2.

Rezultati nas navode na zaključak da agresivni fenotip tumorskih matičnih stanica u uvjetima kroničnog oksidacijskog stresa može postati izraženiji. Promjene izvanstaničnog matriksa koje nastaju kao posljedica oksidacijskog stresa uzrokuju prilagodbe tumorskih matičnih stanica koje im mogu omogućiti preživljenje u uvjetima povećanog oksidacijskog stresa.

Ključne riječi: matične stanice karcinoma, izvanstanični matriks, oksidacijski stres, Nrf2, HNE

## 11. SUMMARY

Authors: Josip Vrančić, Iskra Pezdirc

Title: Oxidative modifications of extracellular matrix induce Nrf2 in breast cancer stem cells

Oxidative stress is an important factor in carcinogenesis. Radiotherapy, chemotherapy and inflammation cause increased oxidative stress in tumors. Lipid peroxidation end product, a reactive aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), is considered to be a second messenger of oxidative stress. HNE modifies the metabolism of cancer cells by interacting with proteins, lipids and DNA. Along with oxidative stress, cancer stem cells have been recognized as the crucial factor in cancer malignancy and are considered responsible for metastasis occurrence, therapy resistance and finally, recurrence of a disease.

We examined the influence of HNE induced oxidative stress and its modulation of extracellular matrix, on cancer stem cells metabolism, proliferation and their antioxidative mechanisms. We demonstrated that modifications of extracellular matrix and chronic oxidative stress of cancer stem cells alter their growth, proliferation and modulate antioxidative mechanisms such as glutathione, catalase and transcription factor Nrf2.

The results suggest that the aggressive cancer stem cell phenotype is enhanced during chronic oxidative stress. Extracellular matrix alterations, resulting from oxidative stress may cause an adaptation of cancer stem cells enabling them to survive increased oxidative stress.

Keywords: cancer stem cells, extracellular matrix, oxidative stress, Nrf2, HNE